

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕРСТИЦИЯ ЛЁГКИХ КРЫС ПОСЛЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

Журавский С. Г.^{1,2}, Юкина Г. Ю.¹, Блюм Н.М.¹, Томсон В.В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Журавский Сергей Григорьевич
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Пархоменко, д. 15 лит. Б, Санкт-Петербург, Россия, 194156.
E-mail: s.jour@mail.ru

Статья поступила в редакцию 29.06.2016
и принята к печати 30.08.2016.

Резюме

Проведен патоморфологический анализ клеточного состава интерстиция лёгких (крысы стока Wistar, самцы, 250-300 г, n=20) после однократного внутривенного введения 1 мл суспензии наночастиц диоксида кремния сферической формы, размером 13 ± 2 нм (2 мг/мл). Изменения оценивались на 21-й и 60-й дни эксперимента. Отмечено нарастание диффузной инфильтрации альвеолярных перегородок макрофагами и лимфоцитами ($p < 0,05$) при незначимом увеличении пула тучных клеток и эозинофилов. Формирования гранулём и пневмофиброза не наблюдалось. Выявленные реактивные изменения указывают на персистенцию дисперсных частиц кремнезёма в интерстициальных пространствах лёгочной ткани в течение всего срока наблюдения. Характер клеточных изменений указывает на то, что биораспределение изучаемых частиц в легких проходит при естественном рекрутировании фагоцитарного потенциала интерстициальных макрофагов.

Ключевые слова: диоксид кремния, SiO₂, наночастицы 12-16 нм, биораспределение, хроническая *in vivo* токсичность, поражение легких, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2016; 3 (4): 66–71.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE INTERSTITIAL LUNG TISSUE IN RESPONSE TO PARENTERAL ADMINISTRATION SILICA NANOPARTICLES

Zhuravskii S. G.^{1,2}, Yukina G. Yu.¹, Blum N.M.¹, Thomson V.V.¹

¹ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

² Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Sergei G. Zhuravskii
Federal Almazov North-West Medical
Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: s.jour@mail.ru

Received 29 June 2016; accepted 30 August 2016.

Abstract

We analyzed pathomorphologic changes of lung interstitium tissue in male Wistar rats (average weight 250-300 g, n=20) after single-pass intravenous administration 1ml (2 mg/ml) 13±2 nm silicon dioxide spherical shape nanoparticles. We estimated tissue reaction on 21 st and 60th days after injection. Diffuse infiltration of alveolar partitions increase was noticed ($p < 0,05$); mast cells and eosinocytes pool increase was not significant. We did not revealed granulomas formation or pneumofibrosis. The revealed changes let us to suppose persistence of dispersible silica dioxide nanoparticles in lung interstitium on all terms of study. Cell reaction trends let us to propose that in lungs nanoparticles distribute with local interstitial macrophages.

Key words: silicon dioxide, SiO₂, 12-16 nm nanoparticles, chronic toxicity in vivo, lesion of lung, macrophages, mast cells.

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (4): 66–71.

Введение

Решение актуальных задач направленной (целевой, таргетной) доставки тормозится дефицитом фундаментальных представлений об органной специфике интернализации дисперсных нанообъектов *in vivo*. Характер капиллярной системы (варианты строения эндотелия и базальной мембраны), особенности лимфатического дренажа, заряд мембран, существование гисто-гематических барьеров, резидентных интраорганных пулов фагоцитов прямо или опосредованно могут оказывать влияние на биораспределение наноразмерных дисперсий [1-3]. Эти морфофункциональные особенности определяют механизмы, которые обеспечивают пассивную направленную лекарственную доставку.

Лёгкое является тем органом-мишенью, для которого сохраняется актуальность исследований по изучению прикладных аспектов целево-

го доступа. Возможность транспорта дисперсных нанообъектов, используемых в качестве лекарственных матриц из капиллярного пространства в альвеолярное и обратно, в условиях существования аэрогематического барьера (АГБ) очевидно зависит от проницаемости компонентов этого барьера [4].

Наш научный интерес определился разработкой общих вопросов неспецифических механизмов, связанных с естественными морфофункциональными особенностями органов-мишеней, которые могут быть вовлечены в направленное биораспределение. Кроме того, мы будем учитывать физические характеристики дисперсных объектов, которые при органных морфофункциональных особенностях будут обеспечивать максимальную пульмо-доступность лекарственных препаратов (размер, форма и заряд наночастиц). С учетом известных

патогенетических примеров [5,6] представляется, что «идеальная лекарственная матрица» для получения оптимальной инкорпорации в лёгкое для случаев парентерального и эндотрахеального введения должна располагать различными физическими характеристиками.

Цель работы — оценить морфологические изменения интерстиция респираторного отдела в ответ на однократное парентеральное введение НЧК.

Материал и методы

Исследование проведено на 20 самцах крыс стока Wistar соматически здоровых, массой 220-250 г. (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Россия), содержащихся в стандартных условиях вивария конвенциональной категории.

Животные были разделены на 2 группы: 1) контроль (n=10) — с введением 1 мл физиологического раствора; 2) экспериментальная группа (n=10) — с введением 1 мл суспензии наночастиц кремнезема (НЧК) в физиологическом растворе.

Объектом исследования явились дисперсные частицы (кремнезем, Аэросил 175), имеющие сферическую форму и размер 13 ± 2 нм («Evonik Industries AG»). Суспензия НЧК вводилась однократно в объеме 1 мл при концентрации кремнезема 2 мг/мл. Инъекции проводили путем катетеризации бедренной вены при соблюдении правил асептики и антисептики. Манипуляции с животными выполнялись в условиях анестезии раствором золетила (6 мг/кг), вводимого внутривенно. При экспериментальных исследованиях руководствовались требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986 г.), Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996 г.) и в соответствии с рекомендациями Этического комитета ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова».

Выведение животных из эксперимента осуществляли по группам из 5 крыс на 21-е и 60-е сутки. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение суток. Для гистологического анализа получали фронтальный срез доли левого лёгкого, фиксированного в спавшемся состоянии, с обязательным присутствием долевого и сегментарных бронхов, лёгочных сосудов и альвеолярной ткани, покрытой висцеральной плеврой. Образцы ткани обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации и заливали в парафиновые блоки по стандартной

гистологической методике.

Для морфологического анализа парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Визуализацию тучных клеток проводили окрашиванием толуидиновым синим (Bio-Optica, Италия) с последующим подсчётом на 10 полях зрения. Для выявления соединительной ткани использовали метод Маллори (Bio-Optica, Италия). Макрофагами считали крупные клетки диаметром 18-25 мкм с выраженной, неправильной формой, вакуолизированной цитоплазмой, имеющие округлое или бобовидное ядро с нежно-дисперсным хроматином и расположенные в интерстиции альвеолярных перегородок. Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия) при окуляре 10, объективе 10 и 40. Фотосъёмку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Морфометрический анализ производили с помощью аппаратно-программного комплекса «Видеотест» на 20 полях зрения при окуляре 10, объективе 40. Подсчитывали относительное количество макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток и эозинофилов, измеряли толщину альвеолярных перегородок и визуально оценивали представительство соединительной ткани.

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили с использованием статистической программы Statistica 7.0. Значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

У контрольных животных в интерстиции респираторного отдела альвеолярные перегородки содержат полиморфный клеточный пул, включающий в основном компоненты макрофагального, лимфоидного ряда и с присутствием эозинофильных лейкоцитов. Тучные клетки в интерстиции данной зоны не выявлялись. В альвеолах отмечались единичные альвеолярные макрофаги.

В результате введения НЧК на всех сроках эксперимента не наблюдалось достоверного изменения толщины альвеолярных перегородок. Вместе с тем отмечено увеличение количества макрофагов и лимфоцитов на 21-й день наблюдения. Характерно, что представительство эозинофилов, тучных клеток и альвеолярных макрофагов значимо не изменялось (табл. 1, рис. 1). Развившиеся изменения сохранялись до окончания эксперимента.

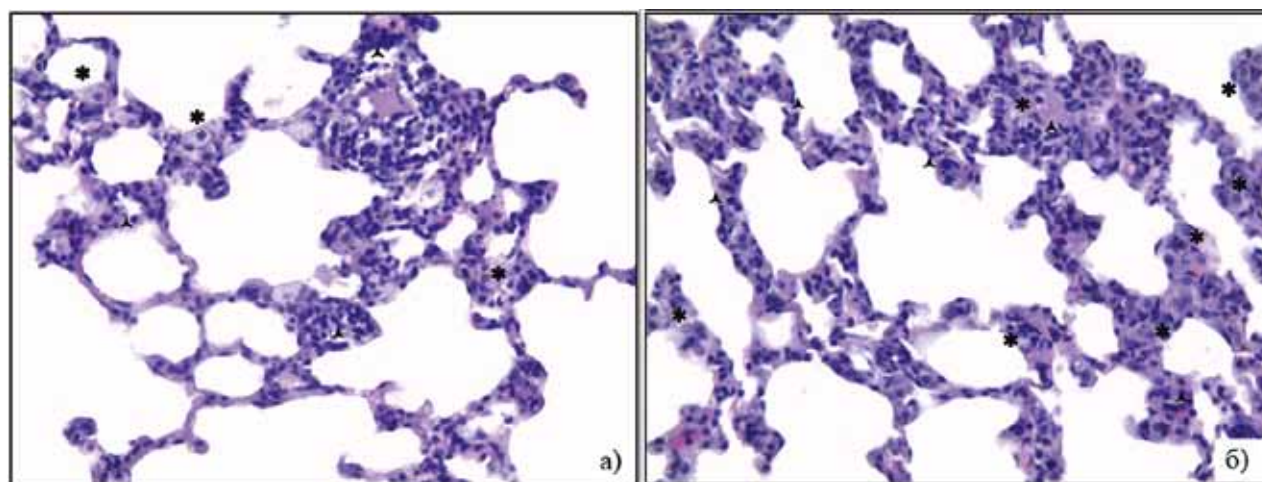
Особенностью гистологических изменений в лёгочной ткани, по сравнению с патоморфоло-

Таблица 1. Динамика морфометрических показателей респираторного отдела лёгкого при однократном внутривенном введении НЧК (2мг/мл)

	21 день		60 день	
	физ.р-р	НЧК	физ.р-р	НЧК
Толщина альвеолярной перегородки, мкм	30,2±3,6	40,3±9,6	31±5,6	30,3±6,1
Количество макрофагов	33,8±8,3	84,5±25,5*	44,5±11,8	102±15,5*
Количество лимфоцитов	51,8±4,3	154±57*	87,2±18,2	228,8±98,2*
Количество эозинофилов	10±3,5	13,8±3,9	6±1,2	11,8±4,2
Количество тучных клеток	0	1±0,05	0	0
Количество альвеолярных макрофагов	1,8±0,8	2,3±0,9	3±0,8	2,4±1,3

* — различия значимы по сравнению с показателями в группе с введением физиологического раствора при $p < 0,05$.

Рисунок 1. Респираторный отдел лёгкого крыс к моменту окончания эксперимента



Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 400. * — интерстициальные макрофаги, ▲ — лимфоциты в интерстиции респираторного отдела.

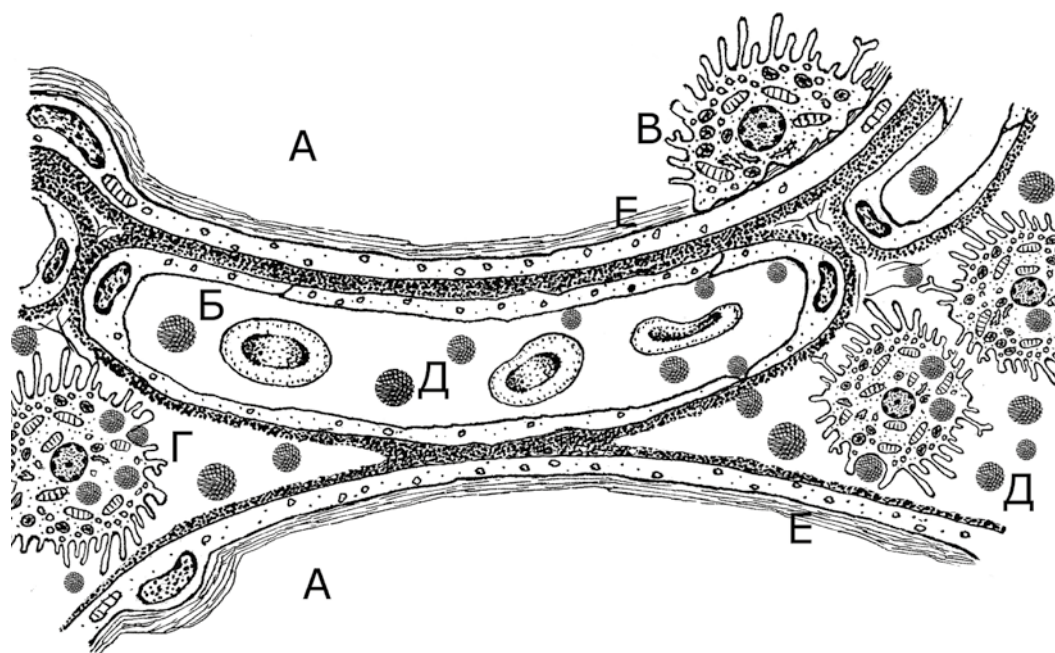
1 а. Введение физиологического раствора.

1 б. Введение суспензии наночастиц диоксида кремния (2 мг/мл).

гической картиной печени при введении такого же образца НЧК, оказалось отсутствие качественно иной реакции резидентного пула макрофагов в виде гранулёмобразования и ассоциированного с ним фиброгенеза [7]. Также в альвеолоцитах не обнаруживалось видимых инородных внутриклеточных включений, представляющих собой агломераты НЧК, какие отмечаются в гепатоцитах [8].

Нарастание пула интерстициальных макрофагов и отсутствие численного увеличения альвеолярных макрофагов мы рассматриваем как результат дифференцированности макрофагов по месту проявления своей функциональной активности. Так, на гематогенный путь инкорпорации НЧК реагируют именно макрофаги интерстиция легких усилением своей защитной (клининговой) функции. При

Рисунок 2. Взаимоотношения элементов аэрогематического барьера и обсуждаемого биораспределения НЧК в интерстиции респираторного отдела легкого (схема)



А. — альвеола; Б. — просвет капилляра; В. — альвеолярный макрофаг; Г. — интерстициальный макрофаг; Д. — наночастицы; Е. — сурфактант.

этом структурная картина респираторного отдела легких в целом указывает на успешное выполнение аэрогематическим барьером своей функции на его промежутке между базальной мембраной и альвеолоцитами (схема 1).

Обнаруженные изменения указывают на способность НЧК размером 13 ± 2 нм проникать через лёгочные капилляры, имеющие непрерывную эндотелиальную выстилку, также как через синусоидные капилляры печени или фенестрированные капилляры почечного клубочка [8]. При этом можно полагать, что среди элементов, составляющих АГБ (эндотелий, базальная мембрана, альвеолоцит I типа и сурфактант), выполнение барьерной функции замыкается на альвеолоците I типа, который не допускает трансцеллюлярного транспорта НЧК. В противном случае, мы наблюдали бы реакцию численного увеличения макрофагов альвеолярного пула. Именно такого рода изменения возникают при аэрогенной инкорпорации аэрозолей дисперсных объектов с известными патогенными свойствами [9,10]

Нашим наблюдением обнаружено, что гематогенно вводимые дисперсии, содержащие НЧК 13 ± 2 нм, проявляя «размерные» физико-химические эффекты, «захламляют» интерстиций легочной ткани и этим стимулируют фагоцитарное поведение макрофагов, преследующих сохранность тканевого гомеостаза. Возрастание и поддержание численности макрофагально-лимфоцитарного пула

в легочной ткани свидетельствует о длительной персистенции НЧК в интерстиции респираторного отдела легкого и, видимо, о замедленной их элиминации (по крайней мере в течение срока наблюдения эксперимента). Морфологические данные о характере кумуляции НЧК в интерстициальных пространствах лёгочной ткани могут быть востребованы для моделирования хронической интерстициальной патологии лёгких, а также учитываться при разработке методик направленной лекарственной доставки [11].

Выводы

1. Однократное внутривенное введение НЧК сферической формы, размером 13 ± 2 нм, вызывает в интерстиции респираторного отдела легкого ответную реакцию в виде диффузной макрофагально-лимфоцитарной клеточной инфильтрации альвеолярных перегородок, персистирующей в течение 2 месяцев без формирования гранулем и стимуляции процесса пневмофиброгеза.

2. Наблюдаемая макрофагальная реакция без привлечения тучных клеток и эозинофилов может трактоваться как результат «аккуратного» выполнения тканевого клининга интерстициальными фагоцитами. Отсутствие изменения в поведении альвеолярных макрофагов при признаках рекрутирования функции интерстициальных макрофагов предполагает о невозможности трансцеллюляр-

ного переноса НЧК изучаемого параметра сквозь альвеолоциты I типа, которые становятся в данном случае главным блокирующим звеном АГБ.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Matoba T, Egashira K. Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease. *Int Heart J*. 2014; 55(4):281-286.
2. Sundar DS, Antoniraj MG, Kumar CS, Mohapatra SS, Houreld NN, Ruckmani K. Recent Trends of Biocompatible and Biodegradable Nanoparticles in Drug Delivery: A Review. *Curr Med Chem*. 2016. [Epub ahead of print].
3. Trevaskis NL, Kaminskas LM, Porter CJ. From sewer to saviour — targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(11):781-803.
4. Fang CL, Wen CJ, Aljuffali IA, Sung CT, Huang CL, Fang JY. Passive targeting of phosphatiosomes increases rolipram delivery to the lungs for treatment of acute lung injury: An animal study. *J Control Release*. 2015;213:69-78.
5. Braakhuis HM, Park MV, Gosens I, De Jong WH, Cassee FR. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014;11:18.
6. Yoshiura Y, Izumi H, Oyabu T. Pulmonary toxicity of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015;17(6):241.
7. Zhuravskii S, Yukina G, Kulikova O, Panevin A, Tomson V, Korolev D, Galagudza M. Mast cell accumulation precedes tissue fibrosis induced by intravenously administered amorphous silica nanoparticles. *Toxicology mechanisms and methods*. 2016; 4: 260-269.
8. Ivanov S, Zhuravsky S, Yukina G, Tomson V, Korolev D, Galagudza M. In vivo toxicity of intravenously administered silica and silicon nanoparticles. *Materials*. 2012; 5(10): 1873–1889.
9. Yu Y, Li Y, Wang W, et al. Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. Xu B, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(4): e61346.
10. Menter DG, Patterson SL, Logsdon CD, Kopetz S, Sood AK, Hawk ET. Convergence of Nanotechnology and Cancer Prevention: Are We There Yet? *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2014; 7(10): 973-992.
11. Carlander U, Li D, Jolliet O, Emond C, Johanson G. Toward a general physiologically-based pharmacokinetic model for intravenously injected nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*. 2016;11:625-40.

Информация об авторах:

Журавский Сергей Григорьевич — д.м.н., рук. группы экспериментальной патоморфологии «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаб. слуха и речи НИЦ «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова»;

Юкина Галина Юрьевна — к.б.н., зав. лаб. патоморфологии НИЦ, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»;

Блюм Наталья Михайловна — научный сотрудник лаб. патоморфологии НИЦ, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»;

Томсон Владимир Викторович — д.м.н., директор НИЦ ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова» Минздрава России, профессор кафедры патологической анатомии «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова».

Author information:

Sergey G. Zhuravskii, MD, Head, Group of Experimental Pathomorphology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Leading Researcher, Laboratory of Hear and Speech, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Galina Yu. Yukina, PhD, Head, Laboratory of Pathomorphology, Research Center of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Natalia M. Blum, Researcher, Laboratory of Pathomorphology, Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Vladimir V. Thomson, PhD, Professor, Director, Research Center, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.